

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

KEEMIA INSTITUUT
BIOORGAANILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Anne Lille
Melanokortiini retseptoreid sisaldavate pungunud bakuloviiruste kogumine
tangensiaalvoolu filtratsiooni meetodil ja selle valideerimine
Bakalaureusetöö

Juhendaja: Sergei Kopantšuk, Ph.D.

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Signaaliülekanne organismis	6
1.2 G-valguga seotud retseptorid	7
1.2.1 Melanokortiini retseptorid	8
1.2.2 MC ₄ retseptorid	9
1.2.3 MC ₄ retseptorite ligandid	10
1.3 Metallioonid organismis	11
1.4 Retseptorite ekspressioonisüsteem	12
1.5 Tangensiaalvoolfiltratsioon	12
1.6 Fluorestsentsanisotroopia	14
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1 Kasutatud materjalid ja aparatuur	15
2.2 Sf9 rakuliini kasvatamine	16
2.3 Ligandid ja muud ühendid	16
2.4 Rekombinantse bakuloviiruse paljundamine	17
2.5 Rekombinantse bakuloviiruse tiitrimine	17
2.6 MC ₄ retseptoreid sisaldavate bakuloviiruste eraldamine	17
2.7 Retseptor-ligand interaktsioonide uurimine	19
3 TULEMUSED JA ARUTELU	20
3.1 Rekombinantse viiruse tiitri määramine	20
3.2 TFF meetodi valideerimine	21
3.2.1 Fluorestsentsligandi seostumise kineetika uurimine MC ₄ retseptorile	22
3.2.2 Fluorestsentsligandi dissotsatsiooni uurimine MC ₄ retseptorilt	22
3.2.3 Fluorestsentsligandi seostumise uurimine MC ₄ retseptorile	24

KOKKUVÕTE	29
KASUTATUD KIRJANDUS	30
SUMMARY	33
LISAD	34

KASUTATUD LÜHENDID

Sf9	– liblikalise <i>Spodoptera frugiperda</i> munasarjast eraldatud rakuliin
ivp	– nakatusvõimeline viiruseosake (ingl. k. <i>infectious virus particle</i>)
MOI	– nakatuskordsus, nakatusvõimeliste viiruseosakeste arv rakkude arvu kohta (ingl. k. <i>multiplicity of infection</i>)
EC50	– kontsentratsioon, mille juures on saavutatud pool maksimaalsest efektist
GPCR	– G-valguga seotud retseptor
DNA	– desoksüribonukleiinhape
MC	– melanokortiin (ingl. k. <i>melanocortin</i>)
cAMP	– tsükliline adenosinmonofosfaat (ingl. k. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
GDP	– guanosiindifosfaat
GTP	– guanosiintrifosfaat
TFF	– tangensiaalvoolu filtratsioon (ingl. k. <i>tangential flow filtration</i>)
DMSO	– dimetüülsulfoksiid
FA	– fluorestsentsanisotroopia
ACTH	– adrenokortikotroopne hormoon (ingl. k. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
MSH	– melanotsüüte stimuleeriv hormoon või melanokortiin (ingl. k. <i>melanocyte stimulating hormone</i>)
EDTA	– etüleendiamiintetraetaanhape (ingl. k. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
NaOH	– naatriumhüdroksiid

SISSEJUHATUS

Elusorganismide funktsioneerimisel on oluline mõista erinevate elutähtsate signaalide vahetamist organismisiseselt ning nende seoseid füsioloogiliste efektidega. Signaaliülekannete uurimiseks mõjutatakse erinevate valkude tööd sünteetiliste molekulidega ning jälgitakse sellega kaasnevaid muudatusi. Info kohaletoimetamise ühe võimalusena rakkudesse peab signaalmolekul seostuma rakupinnal olevale retseptorile, mille aktiveerumisel käivitub vastav signaalirada. Paljude oluliste funktsioonidega on seotud organismides laialt levinud G-valguga seotud retseptorid (GPCR-d). Nende hulka kuuluvate melanokortiini retseptorite signaaliradade kaudu mõjutatakse mitmeid elutähtsaid protsesse inimese organismis, nagu näiteks energiahomöostaas ja seksuaalfunktsioonid, mistõttu pakuvad need retseptorid huvi ravimiarendusfirmadele.

Retseptorite ja signaalmolekulide vaheliste interaktsioonide analüüsimiseks sobivad fluorestsentspektroskoopilised meetodid, mis on ühed madalaimat avastamispiiri võimaldavad spektroskoopilised meetodid. Fluorestsentsanisotroopiaal (FA-I) põhinevad uuringud on efektiivsed reaalajas teostavateks mõõtmisteks ning retseptori ja ligandi vahelise kineetika kirjeldamiseks. Takistuseks võib osutuda vajaliku retseptori kontsentreerimine, mida on elusates kudedes madalates kogustes.

Valkude kogumiseks rakendatakse mitmeid meetodeid nagu tsentrifuugimine ning erinevaid filtreerimise variante, mille ülesandeks on ka ebavajalike peptiidide ja muude komponentide eemaldamine, mis võivad edasist tööd takistada erineval määral. Sagedaseks probleemiks on selle tööfaasi suur ajakulu suuremate proovikoguste puhul, mille võimalikuks lahenduseks on rakendada perspektiivikat tangentsiaalvoolu filtratsiooni (TFF) süsteemi

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on valideerida MC₄ retseptoreid sisaldavate pungunud bakuloviiruste kontsentreerimist tangentsiaalvoolu filtratsiooniga, mille asemel on varasemalt kasutatud tsentrifugeerimist. Retseptorpreparaadi karakteristikuid kontrollitakse FA meetodiga kasutades fluorestsentsmärgisega sünteetilist ligandi Cy3B-SHU9119 analoog 1.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Signaaliülekanne organismis

Hulkaksed organismid koosnevad mitut erinevat tüüpi rakkudest, mis erinevad suuruse, kuju ja funktsiooni poolest. Kõikidel rakkudel aga on olemas teatud struktuursed tunnused. Rakke ümbritseb plasmamembraan, eraldades raku sisu tema ümbrusest. See koosneb lipiididest ja valgu molekulidest, mis moodustavad paindliku ning hüdrofoobse barjääri raku ümber. Membraan on barjääriks anorgaanilistele ioonidele ja paljudele teistele laetud polaarsetele ühenditele. Transportvalgud plasmamembraanis lubavad teatud ioonidel ja molekulidel läbida membraani; retseptorvalgud annavad edasi signaale rakku (Lehninger *et al.* 2008).

Hulkaksetes organismides vahetavad erinevate funktsioonidega rakud laialdaselt signaale. Taimerakud reageerivad kasvuhormoonidele ja päikesevalgusele. Loomarakud vahetavad informatsiooni ioonide ja glükoosi kontsentratsiooni kohta rakuvälises keskkonnas, samuti vastastikusel sõltuvuses oleva metaboolse aktiivsuse kohta, mis toimub erinevates kudedes. Rakkude vaheline reguleeritud interakteerumine vastutab ka näiteks embrüo korrektse arengu eest. Eelnevalt kirjeldatud juhtudel esindavad signaalid informatsiooni, mis tuntakse ära spetsiifiliste retseptorite poolt ja konverteeritakse rakuliseks vastuseks, mis omakorda kaasab alati keemilisi protsesse. Selline informatsiooni muutmine keemiliseks nähtuseks, signaaliülekandek, on universaalne omadus elavatele rakkudele (Lehninger *et al.* 2008). Signaaliülekanne on molekulaarsel tasemel väga suur tähtsus keerukates elusolendites, inimestes. Informatsiooni võivad edasi anda erinevad neurotransmitterid, hormoonid, kasvufaktorid jpt signaalid (Elliott ja Elliott 2009).

Suur enamus signaaliülekanneid algavad siis kui rakuvälised signaalmolekulid (ligandid) interakteeruvad nendele vastavate membraanseotud retseptoritega (Ananthanarayanan ja Kerman 2006). Signaaliülekanne on märkimisväärselt spetsiifilised ja väga tundlikud. Spetsiifilisus saavutatakse signaali ja retseptori molekuli kokkusobivuse alusel, mis esineb tänu sama tüüpi nõrkadele (mittekovalentsete) interaktsioonidele nagu see esineb ka ensüüm-substraat ja antigeen-antikeha interaktsioonide puhul (Lehninger *et al.* 2008). Ligandide retseptorid on tihti märklauaks ravimite väljatöötamisel, mis selgitab signaaliülekanne uurimise tähtsust organismides (Ananthanarayanan ja Kerman 2006).

1.2 G-valguga seotud retseptorid

Membraanseotud retseptoreid klassifitseeritakse struktuuri alusel kolme erinevasse rühma: ühe-transmembraansed retseptorid (valgud, mis läbivad rakumembraani vaid ühe α -heeliksina), ioonkanalid ja seitsme-transmembraansed retseptorid. Viimased esindavadki suurt membraanvalkude rühma, mis edastavad hormoonide või erinevate infokandjate signaale G-valgu abiga efektormolekulile, mis muudab omakorda ionide ja sekundaarse infokandja kontsentratsiooni rakus (Koolman ja Roehm 2003). GPCR-id on seotud paljude tervisehäirete ja haigustega, mis on viidanud mutatsioonidele ja polümorfismile nendes retseptorites. Seega ei ole üllatav, et need retseptorid on märklauaks pea pooltele tänapäeva ravimitele, mis reguleerivad G-valguga seotud retseptorite aktiivsust mingil moel (Conn *et al.* 2009).

GPCR-e leidub nii väiksemates organismides, nagu pärm ja putukad, kui ka suuremates, nagu seda on inimesed. Neile on omane seitse α -helikaalset rakumembraani läbivat segmenti, mis on eraldatud rakusiseste ja -väliste vahelduvate silmustega. Selgroogsetes organismides jagatakse GPCRd tavaliselt viide alajaotusesse toetudes nende järjestusele ja struktuursetele sarnasustele: rodopsiini, sekretiini, glutamaadi, adhesiooni ja *Frizzled/Taste2* perekonda. Vaatamata neile sarnasustele on individuaalsetel GPCR-del ainulaadsed signaaliülekanne mehhanismide kombinatsioonid, mis kaasavad mitmeid G-valgu alatüüpe (Rosenbaum *et al.* 2009). G-valgud on seotud retseptoritega raku tsütoplasmaatilisel poolel ning koosnevad tüüpiliselt kolmest subühikust (α , β ja γ) (Elliott ja Elliott 2009).

G-valgud jagatakse alamrühmadesse sõltuvalt ka nende efektist, millest on järgnevalt välja toodud tuntumad. Stimuleerivad G-valgud on laialt levinud. Need aktiveerivad adenülaadi tsüklaase või mõjutavad ioonkanalite aktiivsust. Inhipeerivad G-valgud omavad pärssivat mõju adenülaadi tsüklaasile. Kolmandasse rühma kuuluvad G-valgud aktiveerivad teist efektorensüümi - fosfolipaas C-d jne (Koolman ja Roehm 2003).

GPCR-de enimlevinud töömehhanismide kohaselt algab signaali andva aine seostumine 7-transmembraansele retseptorile, mis kutsub esile viimase konformatsiooni muutuse sellisel viisil, et vastav G-valk saab kinnituda retseptorile rakumembraani sisemiselt küljelt. See põhjustab α -subühikul GDP vahetumist GTP vastu. Seejärel G-valk eraldub retseptorilt ja dissotsieerub eraldiseisvateks α - ja $\beta\gamma$ -subühikuteks. Mõlemad seostuvad teiste membraanseotud valkudega muutes nende aktiivsust (ioonkanalid avatakse või suletakse, ensüümid aktiveeritakse või inaktiveeritakse) (Koolman ja Roehm 2003). $\beta\gamma$ -subühik

stimuleerib ühe võimalusena kinaasi aktiveerumist, mis fosforüleerib retseptori. See vähendab retseptori ja hormooni vahelise seose tugevust ja viib blokeeriva valgu seostumiseni. α -subühik hüdrolyüsib GTP GDP-ks sekundite kuni minutite jooksul ning sellega termineerib G-valgu aktiivsuse, mis mõjutab adenülaadi tsüklaasi (Koolman ja Roehm 2003).

Signaali edastava aine struktuursed analoogid, mis jäljendavad endogeensete aktiveerivate ligandide efekte, nimetatakse agonistideks. Antagonistidena kirjeldatakse analooge, mis seostuvad retseptorile initsieerimata selle aktivatsiooni ning seetõttu blokeerib agonistide ja endogeensete ligandide mõju (Lehninger *et al.* 2008).

1.2.1 Melanokortiini retseptorid

Melanokortiinide süsteem koosneb melanokortiini peptiididest: α -, β - ja γ -melanotsüüte stimuleerivatest hormoonidest (α -, β - ja γ -MSH) ja adrenokortikotroopsest hormoonist (ACTH); viieliikmelisest G-valk seotud melanokortiini retseptorite perekonnast ja endogeensetest melanokortiini antagonistidest [Aguuti valk ja AgRP (aguuti-sarnane valk ingl. k. *Agouti related protein*)] (Gantz ja Fong 2003). On välja pakutud, et viimased võivad käituda ka pöördagonistidena, mis seostuvad retseptorile alandades basaalselt retseptorite aktiivsuse taset vastupidiselt agonistidele (Chai *et al.* 2003).

MSH ja ACTH retseptorid on olnud pikemat aega tuntud oma füsioloogiliste efektide poolest, mida need esile kutsuvad. Nimelt MSH põhjustab naha pigmentatsiooni ning ACTH initsieerib kortikosteroidide sekretsiooni. Lisaks mõjutavad need peptiidid ka valuvaigistavat toimet, mälu parandamist ja muid efekte (Wikberg 1999).

MC₁ retseptorid on "klassikalised" melanotsüütides esinevad α -MSH retseptorid, kus neil on võtmeroll naha ja juuste pigmentatsioonis. MC₂ retseptorid on adrenokortikotroopsed ACTH retseptorid ning ei oma afiinsust α -, β - ega γ -MSH suhtes. MC₃ retseptorid on ekspresseeritud mitmetes kohtades kesknärvisüsteemis ja sarnaselt MC₅ retseptoritele mitmes perifeerses koes. MC₄ retseptorid on ekspresseeritud enamjaolt kesknärvisüsteemis ning ühiselt MC₃ retseptoriga on seotud energiahomöostaasiga (Gantz ja Fong 2003). Kõik viis retseptori alatüüpi sarnanevad oma aminohappelise järjestuse poolest umbkaudu 40 - 60% ulatuses (Wikberg 1999). Neljandat alatüüpi melanokortiini retseptorid on eriti huvitavad, sest need

on seotud toitumise, tujude reguleerimise, seksuaalfunktsioonidega jpt organismis oluliste ülesannetega (Wikberg ja Mutulis 2008).

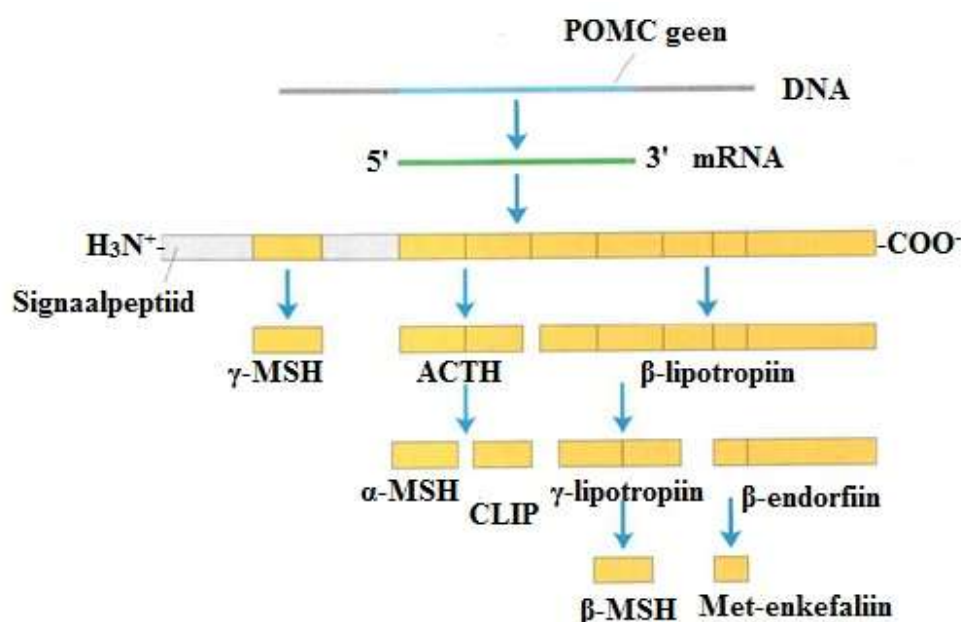
1.2.2 MC₄ retseptorid

Esimene MC₄ retseptori geeni kloon eraldati inimese genoomist I. Gantz'i uurimisrühma poolt toetudes teiste melanokortiini retseptorite (MC₁ - MC₃) geenide homoloogiale. Retseptor on enim sarnane oma aminohappeliselt järjestuselt sellele eelnevalt avastatud MC₃ retseptorile (Gantz *et al.* 1993). MC₄ retseptor on palju laiemalt ekspresseeritud kui MC₃ retseptor ning on farmakoloogiliselt erinev (Mountjoy *et al.* 1994). MC₄ retseptorid on peamiselt ekspresseeritud kesknärvisüsteemis, kus neid võib leida pea igas piirkonnas, aga ka sensoorsetes neuronites perifeerses närvisüsteemis. Neil on väga suur roll toitumisharjumuste kontrollis (Wikberg ja Mutulis 2008). MC₄ retseptorite seos energiahomöostaasiga tõestati 1997. aastal tehes katseid hiirtel. 1998. aastal paljastasid inimgeneetika uuringud, et mutatsioonid selles retseptoris on kõige sagedasemaks ülekaalulisuse ühe vormi põhjustajaks, kusjuures on kirjeldatud vähemalt 150 erinevat mutatsiooni (Tao 2010).

MC₄ retseptorite eriline farmakoloogia ja neuroloogiline jaotus vihjavad spetsiifilistele ja komplekssetele rollidele neuroendokriinsete ja autonoomsete funktsioonide kontrollimises (Mountjoy *et al.* 1994). Sellest ajast saati, kui klooniti esimene MC₄ retseptor, on uuringuid saatnud suured edusammud. Mitmesuguste lähenemiste tulemusena, kaasaarvatud anatoomiline lokalisatsioon, farmakoloogiline regulatsioon, geeniuuringud ning jätkuvad arendused sünteesida uusi peptiide ja väikseid molekulaarseid agoniste ja antagonistide, mida saaks kasutada uute vahenditena, viib mitmete MC₄ retseptorite funktsioonide väljaselgitamiseni. Tähtsad protsessid, mida need retseptorid veel lisaks reguleerivad on glükoosi ja lipiidide homöostaas, kahheksia, valu tajumine jne. Ligandid, mis on suunatud MC₄ retseptoritele võivad potentsiaalselt ravida veel ka seksuaalhäireid, tujude ebaregulaarsusi jm. Edasine teadustöö selles kiiresti laienevas valdkonnas omab suurt perspektiivi (Tao 2010).

1.2.3 MC₄ retseptorite ligandid

Endogeensed MC retseptorite peptiidsed ligandid on pärit proopiomelanokortiini (POMC) geenist (joonis 1). Esialgne geeniprodukt on pikk polüpeptiid, mida töötlevad rida spetsiifilisi proteaase, mille tulemusel saadakse ACTH, β - ja γ -lipotropiin, α -, β - ja γ -MSH jne. Anoreksigeensed, nõ isu pärssivad neuronid toodavad α -MSH-d, mille vabanemisel sunnitakse järgmised neuronid vooluringis saatma signaali edasi ajju, et anda märku toidu tarbimise lõpetamiseks (Lehninger *et al.* 2008).



Joonis 1. Proopiomelanokortiini prekursori proteolüütiline protsessimine. Modifitseeritud (Lehninger *et al.* 2008).

Neljast peamisest endogeensest melanokortiinist omab MC₄ retseptor kõrgeimat afiinsust β -MSH suhtes, millele järgneb α -MSH ja ACTH ning alles seejärel γ -MSH (Schiöth *et al.* 1996). Peptiidsed agonistid seostuvad retseptorile β -leht konformatsioonis, mis muudab selleks tähtsat aminohappelist järjestust His-Phe-Arg-Trp optimaalsesse asendisse retseptori aktiveerimiseks (Hogan *et al.* 2006).

Melanokortiini retseptorid on erilised GPCR-de hulgas selle poolest, et nad on reguleeritud ka endogeensete valguliste pöördagonistide poolt, täpsemini AgRP poolt kesknärvisüsteemis ja Aguti valgu poolt perifeerses närvisüsteemis (Wikberg ja Mutulis 2008).

MC retseptorid on seotud cAMP signaalirajaga stimuleeriva G-valguga (G_s) läbi adenülaadi tsüklaasi ja ka kaltsiumi kontsentratsiooni muutuse kaudu (Gantz ja Fong 2003). Peale

ligandi seostumist MC₄ retseptorile, aktiveerub G_s-valk ning põhjustab cAMP taseme tõusu raku sees (Tao 2010). Hormoonid, mis ajendavad GTP seostumist G_i-valgule, põhjustavad adenülaadi tsüklaasi inhibeerimist, mille tulemusena rakusisene cAMP tase langeb. G_q-valk toimib sarnaselt G_s-valgule initsieerides aga teistsuguste sekundaarsete rakusiseste infokandjate kontsentratsiooni tõusu nagu diatsüülgütserool, Ca²⁺ jt (Lehninger et al. 2008).

1.3 Metallioonid organismis

Vaatamata sellele, et N, S, O, P, C ja H on põhielemendid, millest on bioloogiliste ühendite ehituskivid kokku pandud, on ka teatud metallioonide olemasolu organismis hädavajalik. Bioloogiliste molekulide ja metallioonide interaktsioonid on üldiselt koordinatiivse iseloomuga ja on peamiselt kasutatavad laengu neutraalsuse hoidmiseks. Samuti on metallioonid sageli seotud katalüütiliste protsessidega (Dugas *et al.* 1996).

Mitmed metallid, nagu näiteks Ca, Mg, Zn, Fe jpt on olulised elavatele rakkudele ning moodustavad umbkaudu 3 % inimese kehamassist (Dugas *et al.* 1996). Ca²⁺ ionid kontrollivad laialdaselt rakuprotsesse. Inimese keha sisaldab umbes 1 kilogramm kaltsiumit - ligi 99% sellest on rakendatud struktuurse komponendina luudes ja hammastes, ülejäänud 1% veres ja rakuvälises keskkonnas (ning veelgi väiksem kogus rakusiseses keskkonnas) (Elliott ja Elliott 2009). Ca²⁺ ionid on seotud suuresti nn ionipump mehhanismiga, kus on tegemist metaboliitide aktiivse transpordiga ja ka muude katalüütiliste protsessidega. Siirdemetallid nagu Cu²⁺ ja Zn²⁺ esinevad metalloensüümides, kus ionid interakteeruvad aminohapetega ja tõstavad mingi protsessi aktiivses saidis toimuva reaktsiooni kiirust. Cu²⁺ ja Fe²⁺ ionid seostuvad porfüriini tüüpi prosteetiliste rühmadega ning on kaasatud mitmete elektrontranspordi süsteemidega (Dugas *et al.* 1996).

Mitmed ionid, nagu Na²⁺ Ca²⁺ ja Mg²⁺, mida on olulises koguses rakuvälises keskkonnas, moduleerivad interaktsioone retseptorite ja ligandide vahel. Juba aastakümneid on olnud teada, et Ca²⁺ ionid on seotud rakuvälise ligandi seostumisega retseptorile ning sellest tulenevalt rakusisese vastuse saamisega (Rasmussen ja Rasmussen 1990). Ligandide interaktsioonid metallioonidega on atraktiivne uurimisvaldkond, kuna see aitaks paremini mõista peptiidsete ja ka teist tüüpi ligandide konformatsioonilisi olekuid. (Ananthanarayanan 1991). Uurides nende omavahelisi seostumisomadusi, võib see tuua kasu efektiivsemate retseptoritele suunatud ravimite välja töötamisele (Ananthanarayanan ja Kerman 2006).

1.4 Retseptorite ekspressioonisüsteem

Spetsiifilisi valke on organismides vaja küllaltki madalates kontsentratsioonides, seega nende laiaulatuslik isoleerimine poleks ökonoomselt teostatav. Selliseid valke saab toota üleekspresseerimise teel bakterites või eukariootsetes rakkudes, milleks isoleeritakse vastav geen inimese DNAST ning kloonitakse ekspressiooni plasmidi. Lisaks geenile endale peab plasmid sisaldama DNA segmente, mis lubaksid replitseerumist ning vajalikku valku kodeeriva geeni transkriptsiooni peremeesraku poolt (Koolman ja Roehm 2003).

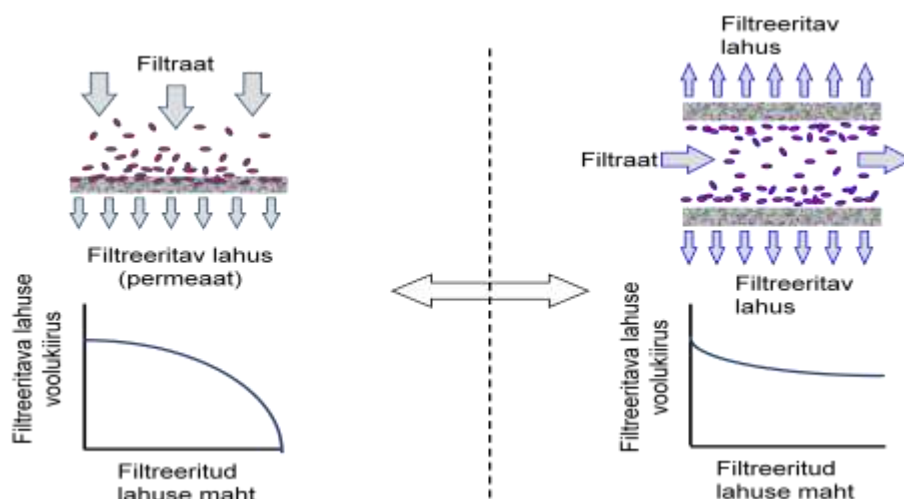
Võõra geeni ekspresseerimisel on väga oluline bioloogiliselt aktiivse rekombinantse valgu tootmiseks õige süsteemi valimine. Bakteriaalsetes süsteemides toodetud rekombinantsed peptiidid on tihti lahustumatud, agregeerunud ja ebakorrektselt kokku pakitud. Putukarakkudel põhinev bakuloviiruste ekspressioonisüsteem on aga üks mitmekülgsem eukariootne ekspressioonisüsteem, millega on võimalik toota valke, mis sisaldavad korrektset voltumist, disulfiidsidemete moodustumist ja oligomerisatsiooni ning lisaks posttranslatsioonilisi modifikatsioone (glükosüleerimine, fosforüleerimine jne) (PharMigen 1999). Nimetatud süsteem koosneb kahest tähtsast osast. Esiteks bakuloviiruse ekspressioonivektorist, milleks on selgrootute viirus, mille ülesandeks on võõra geeni kohaletoimetamine rakku ning seejärel huvipakkuva valgu tootmine. Teiseks on peremeesrakk, milleks tavaliselt kasutatakse liblikaliste rakuliine (Jarvis 2009). Sf9 rakud ekspresseerivad GPCR-e palju kõrgematel kontsentratsioonidel kui imetajate rakud ning neid on kergem ning odavam kasvatada suurte valgu koguste tootmiseks (Schneider ja Seifert 2010).

1.5 Tangensiaalvoolfiltratsioon

Tangensiaalvoolu filtratsioon (TFF – ingl. k. *tangential flow filtration*) on efektiivne filtratsioonimeetod biomolekulide kontsentreerimiseks alates milliliitristest kogustest ulatudes tuhandete liitriteni. Meetodit võib kasutada nii suurte kui ka väikeste biomolekulide fraktsioneerimiseks, raku suspensioonide kogumiseks, rakulüsaadi puhastamiseks jne. (Pall Life Sciences 2009). Tavalise filtratsiooni ja TFF erinevust aitab mõista filtraadi kinnipidamise mehhanism. Viimase tõhusus sõltub suuresti membraani võimest täita efektiivset pinnafiltratsiooni, eriti siis kui on tegemist suspensiooni või kolloidosakestega (Vogel ja Todaro 1997). Efektiivne pinnafiltratsioon sõltub süsteemile rakendatavast rõhust,

mille tõustes tõuseb ka voolukiirus ning filtraat ei jää membraanile kinni kogu protsessi ajaks vaid kinnitub hetkeks ja naaseb ringlusesse, ummistamata membraani.

Tavalisel filtreerimisel rakendatav rõhk surub kogu vedeliku filtrist läbi, tootes lahuse, mis on tavaliselt osakestevaba, samal ajal kui membraanile jäänud osakesed moodustavad filtraadi, mis on üldjuhul kasutuskõlbmatu. Töö käigus muutub filtraat aina paksemaks, mille tulemusel filtratsiooni intensiivsus konstantsel rõhul väheneb. Kui filtreerimise kiirus on jäänud väga väikseks või on rakendatud suurim võimalik rõhk, on see vaja katkestada kas filtri puhastamise või vahetamise eesmärgil. Sellise katkendliku töö tegemine võib osutuda vägagi ebasoodsaks, kui tegemist on suurte lahuse kogustega. TFF abil on võimalik seda vältida rakendades efektiivset vedeliku juhtimist üle membraani, et kontrollida kontsentratsioonipolarisatsioonist tingitud kihi paksenemist. Sellel meetodil on võimalik koguda nii membraani läbitungivat lahust kui ka membraani mitteläbivate osakeste lahust (Vogel and Todaro 1997). Nende meetodite võrdlust illustreerib joonis 2.



Joonis 2. Klassikalise filtratsiooni ning TFF meetodi võrdlus. Modifitseeritud (Pall Life Sciences 2009).

Membraankassettide kasutamise viis TFF süsteemis sõltub spetsiifilisest rakendusest. Tähtsate parameetrite alla kuuluvad filtreeritava lahuse voolukiirus üle membraani, membraanile rakendatav rõhk, temperatuur, produkti omadused, membraani pooride suurus. Nende parameetrite varieeruvus võib mõjutada filtreerimismeetodi kvaliteeti ja reprodutseeritavust (Pall Life Sciences 2009).

TFF konkureerib lahustunud või lahustumatute komponentide eraldamise ja kontsentreerimise meetodina traditsioonilistest näiteks tavalise filtratsiooniga ja tsentrifuugimisega. Viimane vajab keerukat hooldamist ja on üsna kallis. Ka TFF-i süsteem on kallis, kuid mõningal juhul efektiivsem (Pall Life Sciences 2009). Bakuloviiruste eraldamisel rakususpensioonist peaks eeldustekohaselt olema sobilik TFF meetod, kuna töö käigus saavad viiruse osakesed vähem kahjustada, kui tsentrifuugimise käigus tsentrifugaaljõudu rakendades. Tavaline filtreerimine on sellise töö tegemiseks ebasoodne, kuna suuremate lahusekoguste kui mõne milliliitriga töötamisel peaks filtreid vahetama liiga tihti.

1.6 Fluorestsentsanisotroopia

Fluorestsentsanisotroopia (FA) mõõtmised on võimas abivahend teostamaks biokeemilist uurimistööd ja meditsiinilisi teste (Lakowicz 2006). Peale selle, et proovi ergastatakse polariseeritud valgusega on ka emissioonina saadav valgus polariseeritud. Emitteerunud valguse polarisatsiooni ulatust kirjeldatakse anisotroopia. Proovidel, millel on nullist erinev anisotroopia, loetakse omavat polariseeritud emissiooni. Anisotroopia päritolu on tingitud dipoolmomentide olemasolust absorptsiooni ja emissiooni jaoks, mis paiknevad kindlas suunas fluorofoori struktuuris. Homogeenses lahuses on fluorofoorid kõik suvaliselt orienteeritud. Polariseeritud valguse suunamisel proovile ergastuvad eelistatult fluorofoorid, mille absorptsiooni dipoolmomentid on orienteeritud ühes suunas pealelangeva valguse elektrilise vektoriga, seega suur osa ergastatavatest molekulidest omavad dipoolmomente polariseeritud valguse elektrilise vektori suunaga samas suunas (Lakowicz 2006).

Emissioon võib depolariseeruda mitmel põhjusel, sõltuvalt proovist. Kõikidel kromofooridel on dipoolmomentid, mis ilmnevad kindlas suunas molekulaarsel teljel. Rotatsiooniline difusioon muudab dipoolmomentide suunda ja on üks tavalistest depolarisatsiooni põhjustest. Anisotroopia mõõtmised paljastavad keskmise fluorofoori nurga muutuse, mis ilmneb footoni absorptsiooni ja sellele järgneva emissiooni vahel. Rotatsiooniline difusioon sõltub solvendi viskoossusest ning pöörleva molekuli suurusest ja kujust. Väikeste fluorofooride jaoks madala viskoossusega lahuses rotatsiooniline difusioon on tüüpiliselt kiirem kui emissioon. Sel juhul on emissioon depolariseerunud ja anisotroopia on lähedane nullile (Lakowicz 2006).

Anisotroopia sõltuvus fluorofoori liikumisest on viinud selle nähtuse rakendamisele mitmel viisil biokeemilistes uurimistöödes. Põhjuseks on biomolekulide roteerumise kestvuse võrreldavus paljude fluorofooride fluorestsentselueaga (Lakowicz 2006). FA on sobiv seostumisreaktsioonide detekteerimiseks. Molekulaarsete interaktsioonide tagajärjel muutub tavaliselt fluorestsentsmärgise rotatsiooniline mobiilsus, mida saab tõlgendada FA muutusena ning kasutada fluorestsentspektroskoopilistes uurimustes (Hovius *et al.* 2000).

Enamus katsete jaoks proov ergastatakse vertikaalselt polariseeritud valgusega. Valguse elektriline vektor on orienteeritud paralleelselt vertikaalse või z-teljega. Emissiooni intensiivsust mõõdetakse läbi polarisaatori või polarisaatorite. Kui emissiooni polarisaator on paralleelselt orienteeritud ergastava valgusega, tähistatakse seda intensiivsust tähisega I_{\parallel} . Kui polarisaator on perpendikulaarne ergastava valguse suhtes tähistatakse intensiivsust sarnase tähisega I_{\perp} . Neid intensiivsuse väärtusi kasutatakse anisotroopia arvutamiseks valemiga 1.

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

Anisotroopia on dimensioonita väärtus, mis ei sõltu kogu proovi intensiivsusest. Seda sellepärast, et erinevus ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) on normeeritud kogu intensiivsuse poolt, milleks on $I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ (Lakowicz 2006). Seega fluorofooriga märgistatud ligandide anisotroopia väärtused sõltuvad vaba ja seotud ligandi vahekorra ja mitte kogu ligandi kontsentratsioonist (Veiksina *et al.* 2010).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud materjalid ja aparatuur

Sf9 rakkude kasvatamiseks kasutati söödet EX-CELL 420 (Sigma) ning elumuse kontrollimiseks rakendati Olympus CKX31 mikroskoopi ja rakuloendurit TC10 Automated Cell Counter (Bio-Rad). Elus rakkude ulatus määrati 0,4% trüpaansinise (BioTop). Bakuloviiruse kogumiseks rakendati tsentrifuugi Sigma Laborzentrifugen mudelit 3K30 (Sigma). Nakatunud rakkude keskmise diameetri mõõtmiseks kasutati rakuanalüsaatorit Z2TM Series COULTER COUNTER® Cell and Particle Counter (Beckman Coulter) Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogiainstituudis prof. Kristjuhani loal. Läbimõõdu määramiseks kasutati isotoonilist lahust ISOTON® II Diluent (Beckman Coulter).

MC₄ retseptoreid sisaldavate bakuloviiruste lahuse kontsentreerimiseks kasutati peale tsentrifuugi ka TFF süsteemi LV Centramate™ Lab Tangential Flow Filtration System (Pall®) koos Omega™ Membrane LV Centramate™ Cassettes membraanidega, mille läbilaskvusteks olid 100 kD ning 300 kD (Pall®).

Retseptor-ligand interaktsioonide uurimiseks kasutati Pherastar BMG Labtech plaadilugejat. Fluorestsentsmärgisega ligandide katsed teostati mustas, lamedapõhjalises, 96-kohalises, mittesiduva pinnaga polüstüreenist mikroplaadis (Corning, Product No. 3993).

Katsetulemuste andmetöötamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 5.0 ning graafikute visualiseerimiseks MATLAB R2011a.

2.2 Sf9 rakuliini kasvatamine

Spodoptera frugiperda munasarjakoest eraldatud Sf9 rakuliini kasvatati seerumivabas söötmes 27 °C juures CO₂-vabas keskkonnas. Rakuliini kasulikuks omaduseks on võimalus kasvada nii suspensioonis kui ka mingil pinnal kinnitatuna (Jarvis 2009). Antud töös rakendati esimest moodust, mis võimaldab produtseerida suuremates kogustes rakke. Rakususpensioone inkubeeriti loksutil ning hoiustati Erlenmeyer'i kolbides. Viiruse kogumiseks ning selle tiitri määramiseks kasutati eksponentsiaalses kasvufaasis rakke, mille elumus oli vähemalt 85%, samal ajal kui rakutihedus säilitati vahemikus 0,6 mln/ml kuni 3,7 mln/ml.

2.3 Ligandid ja muud ühendid

Antud bakalaureusetöös kasutati kahte erinevat tüüpi ligande retseptor-ligand interaktsioonide uurimiseks. Ligandid säilitati -20 °C juures DMSO-s (dimetüülsulfoksiidis) (Sigma-Aldrich), mis on vajalik ligandilahuste paremaks säilitamiseks hüppelistel temperatuurivahetustel. Fluorestsentsmärgisega Cy3B kasutatavaks märgistatud ligandiks oli SHU9119 analoog 1 (varasemalt avaldatud Peptiid-1a nime all), mis olid sünteesitud eritellimusena (Link 2012). Konkureeriva märgistamata ligandina kasutati NDP- α -MSH-d (Tocris).

Vajalikku retseptorit transkribeeritavat DNA-fragmenti sisaldavad bakuloviirused retseptorite kogumise ja kontsentreerimise süsteemina on välja pakutud varasemalt Bioorgaanilise keemia õppetooli teaduri Santa Veiksina poolt (Veiksina *et al.* 2010; Veiksina *et al.* 2014).

2.4 Rekombinantse bakuloviiruse paljundamine

Bakuloviiruse amplifitseerimiseks nakatati eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid Sf9 rakke - 80 °C juures hoitavat viirusevaru kasutades. Antud viirusevaru kontsentratsioon oli eelnevalt määratud raku suuruse muutusel põhineva viiruse tiitrimise teel ($6,49 \times 10^7$ ivp/ml). Sf9 rakke nakatati nakatuskordsuse $MOI = 2$ juures, kui rakulahuse tihedus oli 2 mln rakku/ml ning keskmine elumus 96 %. Peale 53-tunnist inkubatsiooniga oli rakkude elumus langenud 12 %-ni, misjärel teostati tsentrifuugimine 10 minutit temperatuuril 4 °C 1000 g juures (tsentrifuug Sigma Laborzentrifugen mudel 3K30, rootor 11390). Saadud supernatant, mis sisaldas rekombinantseid bakuloviirusi, valati ümber uude 50 ml tuubi ning amplifitseeritud viirusevaru säilitati valguskindlalt 4 °C juures.

2.5 Rekombinantse bakuloviiruse tiitrimine

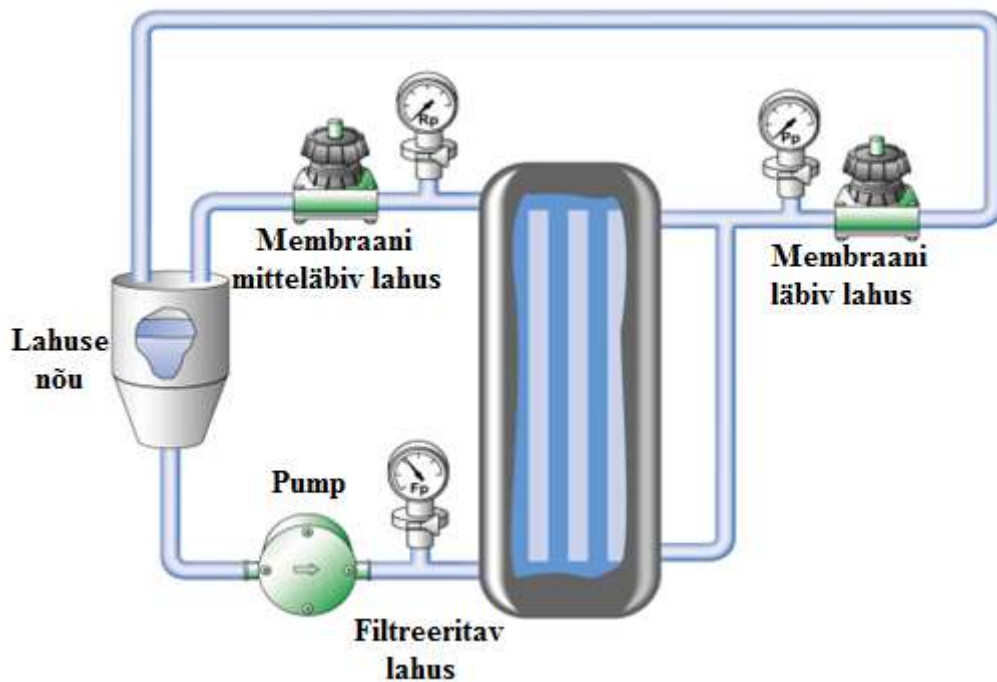
Bakuloviiruse lahuse kontsentratsioon määrati kasutades raku suuruse muutusel põhinevat tiitrimist. Katse läbiviimisel toetuti Janakiraman *et al.* poolt teostatud tiitrimiskatsetele mõningate modifikatsioonidega (Janakiraman *et al.* 2006). Rakulahus, tihedusega 0,8 mln rakku/ml, kanti 24-kohalisele rakukasvatusplaadile (Nunc), igasse süvendisse sisestades 250 µl ExCellTM söödet, milles oli ligikaudu 2×10^5 rakku. Plaadid tõsteti inkubaatorisse 27 °C juurde 60 minutiks, et rakud kinnituksid. Tiitrimiseks mõeldud viirusevarust valmistati 12 seerialahjendust duplikaatides, igasse süvendisse lisades 250 µl erinevaid lahjendusi. Peale 24-tunnist inkubatsiooni järgnes rakkude keskmise diameetri ja arvu määramine, kasutades Z2TM Series COULTER COUNTER® Cell and Particle Counter instrumenti.

2.6 MC₄ retseptoreid sisaldavate bakuloviiruste eraldamine

Sf9 rakkudelt pungunud bakuloviiruste kogumiseks kasutati eelpool kirjeldatud kahte meetodit: tsentrifuugimist ning tangentsiaalvoolu filtratsiooni.

Viirusega inkubeeritud rakususpensioon tsentrifuugiti esmalt 10 minutit 1000 g juures, misjärel supernatant eemaldati ning lahus jagati kaheks, millest ühe poolega korraldi tsentrifuugimist 48000 g juures 40 minutit. Saadud sade, mis sisaldas pungunud bakuloviirust resuspendeeriti modifitseeritud Krebs-Ringeri puhvril, mille pH oli 7,4 ning koosneb tüüpiliselt järgnevatest komponentidest: 11 mM Na-Hepes, 0,1 mg/ml BSA, 135 mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich). Resuspendeerimiseks kasutati

puhvrit, mis ei sisaldanud Ca^{2+} ega Mg^{2+} ioone. Algse rakususpensiooni ruumala ning kontsentreeritud viiruselahuse ruumala suhteks oli 1:15.



Joonis 3. Rakendatud TFF ringsüsteem. Modifitseeritud (Pall Life Sciences 2009).

Teise poole lahusega teostati bakuloviiruse kontsentreerimine TFF meetodil. Antud töös oli eesmärgiks membraani mitteläbiva lahuse kogumine, mis sisaldas suuremaid bakuloviiruse osakesi, eraldada nad rakulüsaadist, kaasa arvatud proteaasidest. Vastasel juhul toimuks valkude degradeerumine, mis omakorda põhjustaks fluorestsentsanisotroopia signaali ebastabiilsuse ehk languse ajas ilma et konkureerivat määrgistamata ligandi oleks lisatud.

Filtreerimine teostati joonisel 3 toodud ringsüsteemiga mõningate ümberpaigutustega. Esialgu eemaldati rakususpensioon ning eeldatavasti ka proteaasid ning muud väiksemad osakesed. Kui filtreeritava lahuse ruumala oli vähenenud umbes 0,75 % esialgsest lisati süsteemi neli korda väiksemate kogustega kokku 150 ml Krebs-Ringeri puhvrit, et eemaldada põhjalikult ebavajalikud komponendid. Viimase etapina katkestati ringsüsteem ning koguti kontsentreeritud MC_4 retseptoreid sisaldavate bakuloviiruste lahus, mille ruumala suhe esialgsesse oli 1:10.

2.7 Retseptor-ligand interaktsioonide uurimine

Kontrollimaks MC₄ retseptorite olemasolu kontsentreeritud bakuloviiruse lahustes teostati varasemalt kindlaks tehtud kõrge afiinsusega Cy3B fluorofooriga märgistatud SHU9119 analoog 1 ligandiga FA meetodil põhinev küllastuskatse (Link 2012).

Mõõtmiseks kasutatud fluorimeetrit Pherastar BMG Labtech kalibreeriti standardaine erütrosiin B-ga, millega korregeeriti fotokordistitorude võimendust (Thompson *et al.* 2002). Standardainete kasutamine keemilistes analüüside täpsuse säilitamiseks on vajalik ja nii ka fluorestsentspektroskoopias. Selline aine võiks olla stabiilne, kergesti kasutatav, transporditav ja odav. Proovide ergastamiseks kasutati 540 nm ja emissiooni registreerimiseks 590 nm filtrit. Pilu laiuks oli 20 nm. FA mõõtmistel saadud anisotroopia väärtused koguti kindla ajalise perioodi vältel fluorestsentsintensiivsusi registreerides kindlatel ajahetkedel.

Reaktsioonikeskkonnana kasutati modifitseeritud Krebs-Ringer puhvrit. Võimalike proteolüütiliste reaktsioonide vältimiseks lisati puhvrissi EDTA-vaba proteaasi inhibiitori kokteili (Roche Applied Science) ning signaali stabiliseerimiseks 0,1 % Pluronic F-127 (Invitrogen). Ioonmõjude uurimiseks teostati ka katsed puhvriga, mis ei sisaldanud CaCl₂ ega MgCl₂. Mikroplaadis oli proovide ruumalaks igas süvendis 100 µl ning temperatuur mõõtmise vältel oli 27 °C.

Assotsatsioonikineetika uurimiseks mõõdeti Cy3B-SHU9119 analoog 1 fluorestsentsignaali märgistamata konkureeriva ligandi puudumisel ning olemasolul lahuses, milles saadi vastavalt totaalse ning mittespetsiifilise seostumise FA väärtused. Baasijoont korregeeriti bakuloviiruse lahusest ning bakuloviiruse lahusest ja NDP- α -MSH-st tekitatud signaale arvesse võttes.

Dissotsatsioonikineetika kirjeldamiseks lisati märgistatud ligandi sisaldavasse proovi NDP- α -MSH-d lõppkontsentratsiooniga 3 µM ning 2 µl sobiva sisaldusega Krebs-Ringer puhvrit ülejäänud katsepunktidesse mikroplaadil ning jätkati mõõtmist. Dissotsatsioon algatati 90 min peale katse algust. Kogu katse alguseks loetakse märgistatud ligandi lisamise hetke reaktsioonisegusse ning dissotsatsiooni alguseks vastavalt märgistamata ligandi lisamise momenti.

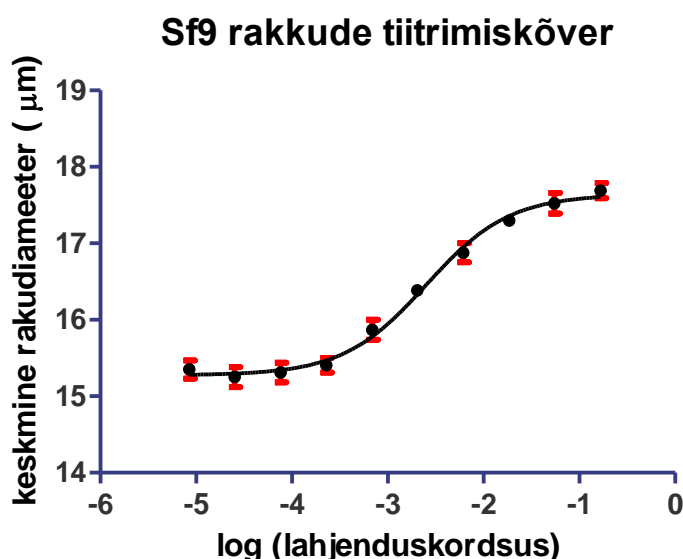
Kõigi punktide kineetika uurimiseks tehti bakuloviiruse lahusest 12 seerialahjendust ning mõõtmised teostati duplikaatides. Märgistatud ligandi lõppkontsentratsioon ühes mikroplaadi punktis oli 1 nM ning märgistamata ligandi kontsentratsioon 3 μ M.

Katseandmetega teostati globaalanalüüs, mis baseerub lisades toodud diferentsiaalvõrrandisüsteemidel. Sellise analüüsiga on võimalik katsetest saadud andmemassiividest eraldada vajalik informatsioon, milleks on antud töös on retseptor-ligand seostumise kineetilised parameetrid ning MC₄ retseptoreid sisaldavate lahuste kontsentratsioon.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Rekombinantse viiruse tiitri määramine

Viiruse tiitri määramine on oluline samm, et kindlustada funktsionaalsete osakeste tootmist rekombinantsete viiruste konstrueerimisel ning nende varude amplifitseerimisel. Katses määrati tiiter toetudes nähtusele, kus raku läbimõõt kasvab pärast viirusega nakatumist. Bakuloviirustega nakatunud Sf9 rakkude diameeter võib suureneda ligikaudu 40 % (Janakiraman *et al.* 2006).



Joonis 4. Sf9 rakkude keskmise rakudiameetri sõltuvus lahjenduskordsusest.

Katsetulemusi analüüsiti sigmoidse kontsentratsioon-vastus kõvera abil, mida on näha joonisel 4, kus on kujutatud ka paralleelmõõtmiste standardhälbed. Kontsentratsiooni arvutamisel lähtuti lihtsustusest, et 24-tunnise nakatusperioodi jooksul rakkude jagunemist ei toimu. Tulemus leiti rakendades valemit 2.

$$C_{\text{viirus}} = \frac{50\% \text{ maksimaalselt nakatunud rakkude arv}}{EC_{50} \times V_{\text{lahus süvendis}}} \quad (2)$$

Maksimaalseks nakatunud rakkude arvuks kasutati kõige kangema viiruse kontsentratsiooniga süvendis mõõdetud rakkude arvu. Tiitrimisel saadud viiruse kontsentratsiooniks saadi $1,19 \times 10^8$ ivp/ml ning keskmine $pEC_{50} \pm SD = 2,6 \pm 0,1$.

3.2 TFF meetodi valideerimine

TFF töötingimused peab tegema kindlaks teostades korduskatseid, hinnates tulemusi ning parandades vastavalt tingimusi ehk tuleb teostada optimeerimine, mis on ka minu bakalaureusetöö ning retseptor-ligand interaktsioonide täpsemini uurimise tähtsaks osaks.

Enne TFF meetodi rakendamist puhastati viiruselahus rakulüsaadist tsentrifuugi kasutades eelnevalt kirjeldatud viisil ning hoiustati 24 tundi 4 °C juures. Filtreerimine teostati 27 °C juures kasutades lahustina modifitseeritud Krebs-Ringeri puhvrit ilma $CaCl_2$ ja $MgCl_2$. Filtrina kasutati 100 kD läbilaskvusega membraani. Filtreerimisel täheldati aga küllaltki suurt vahutamist, mistõttu võis retseptori kontsentreerimise saagikus väheneda. Hilisem retseptor-ligand interaktsioonide uurimine paljastas väga madala seostumise signaali, mis võis tähendada, et retseptor oli degradeerunud lahusesse jäänud võimalikke proteaaside toimet.

Järgneval katsel koguti viiruselahus ning samal päeval viidi läbi ka retseptori kontsentreerimine. Filtreerimine teostati 27 °C asemel 4 °C juures, vältimaks võimalikke proteolüütilisi reaktsioone. Välja vahetati ka membraan, mille uueks läbilaskvuseks oli 300 kD. Et ära hoida lahuse vahutamist ei lisatud puhvriss membraanide kontsentreerimise ajaks 0,1% Pluronic F-127 lahust, mille ülesandeks on stabiliseerida signaali anisotroopia mõõtmistel mõjutamata ligandi seostmist MC_4 retseptorile (Do *et al.* 2006).

3.2.1 Fluorestsentsligandi seostumise kineetika uurimine MC₄ retseptorile

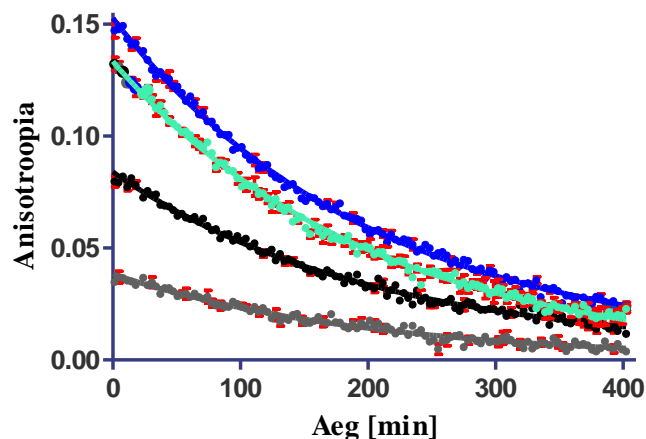
FA rakendamist on varasemalt takistanud sobiva fluorestsentsmärgisega seotud ligandide olemasolu, kõrge tundlikkusega ja kiire lugemiskiirusega plaatfluorimeetri kättesaadavus ja detekteeritava retseptori kontsentratsiooni saavutamine. Spetsiaalsete polarisaatoritega plaadilugeja kasutamine võimaldab vältida mõõtmiste tegemisi küvetis vähendades tunduvalt ajakulu, detekteerida nanomolaarsetes kogustes fluorofoore ning teostada kineetilist analüüsi mitme prooviga samal ajal (Veiksina *et al.* 2010).

Seostumise kineetika uurimiseks kasutati fluorestsentsanisotroopia väärtuseid, mis arvutati valemi 1 abil, kasutades läbi kahe polarisaatori detekteeritud fluorestsentsintensiivsuseid. Reaktsioonikeskkondadena kasutati modifitseeritud Krebs-Ringer puhvrit koos ja ilma Ca²⁺ ja Mg²⁺ ionideta.

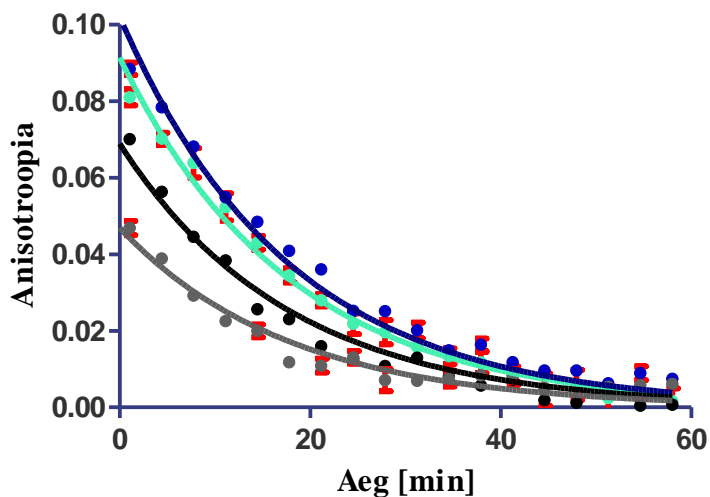
3.2.2 Fluorestsentsligandi dissotsatsiooni uurimine MC₄ retseptorilt

Dissotsatsioonireaktsioon on esimest järku reaktsioon ning sõltub vaid retseptor-ligandi kompleksi kontsentratsioonist. Fluorestsentsintensiivsused mõõdeti märgistamata ligandi puudumisel ning juuresolekul, saades vastavalt totaalse ning mittespetsiifilise seostumise signaali. Dissotsatsioonigraafikutel on kujutatud spetsiifilise seostumise signaal, mis on saadud mittespetsiifilise seostumise signaali mahalahustamisel totaalsest. Ligandi ning retseptori assotsatsiooni uurimiseks teostati dissotsatsiooni analüüs, millest saadud kiiruskonstandiga k_{off} oli võimalik edasine uurimus läbi viia.

Tsentrifuugi abil kogutud MC₄ retseptoreid sisaldava bakuloviiruse preparaadiga teostati Cy3B-SHU9119 analoog 1 dissotsatsioon erinevatel retseptorite kontsentratsioonidel. Dissotsatsioon algatati 90 min peale seostumisreaktsiooni algust lisades reaktsioonisegusse NDP- α -MSH-d lõppkontsentratsiooniga 3 μM . Samas formaadis viidi läbi katsed koos ja ilma Ca²⁺ ning Mg²⁺ ionideta ning kiiruskonstandid saadi vastavalt $k_{\text{off}}=0,0049\pm0,0004 \text{ min}^{-1}$ ja $k_{\text{off}}=0,049\pm0,008 \text{ min}^{-1}$. Ilma ionideta läbi viidud katses saadud konstandid on ühe suurusjärgu võrra suuremad, mida illustreerivad joonised 5 ning 6.



Joonis 5. 1 nM Cy3B-SHU9119 analoog 1 dissotsatsioon MC_4 retseptori kompleksist. Dissotsatsioon algatati pärast 90 minutist retseptor-ligand kompleksi preinkubatsiooni. Reaktsioonikeskkonnana kasutati modifitseeritud Krebs-Ringeri puhvrit ning erinevaid MC_4 retseptorite kontsentratsioone, mis arvutati pärast seostumiskineetika globaalanalüüsi: 4,00 nM (tumesinine); 9,00 nM (helesinine); 0,54 nM (must) ja 0,24 (hall). Saadud $k_{off}=0,0049\pm0,0004 \text{ min}^{-1}$.



Joonis 6. 1 nM Cy3B-SHU9119 analoog 1 dissotsatsioon MC_4 retseptori kompleksist. Dissotsatsioon algatati pärast 90 minutist retseptor-ligand kompleksi preinkubatsiooni. Reaktsioonikeskkonnana kasutati modifitseeritud Krebs-Ringeri puhvrit ilma metalliioonideta ning erinevaid MC_4 retseptorite kontsentratsioone, mis arvutati pärast seostumiskineetika globaalanalüüsi: 0,76 nM (tumesinine); 1,00 nM (helesinine); 0,51 nM (must) ja 0,02 (hall). Saadud $k_{off}=0,049\pm0,008 \text{ min}^{-1}$.

Sarnased dissotsatsioonigraafikud saadi ka TFF süsteemiga kogutud MC₄ retseptoreid sisaldava bakuloviiruse preparaadiga, kusjuures kiiruskonstandid varieerusid samuti ühe suurusjärgu piires (koos ja ilma ionide juuresolekuta katsetes vastavalt: $k_{\text{off}}=0,0041\pm0,007 \text{ min}^{-1}$ ja $k_{\text{off}}=0,048\pm0,016 \text{ min}^{-1}$).

Oluline on märkida, et dissotsatsioon kulges kõigis katsepunktides lõpuni ning selle kiirus ei sõltunud retseptor-ligand kompleksi kontsentratsioonist, küll aga metalliioonide olemasolust. Sarnaselt varasematele uuringutele on tõestatud metalliioonide mõju olulisus retseptor-ligand interaktsioonidel (Veiksina *et al.* 2010).

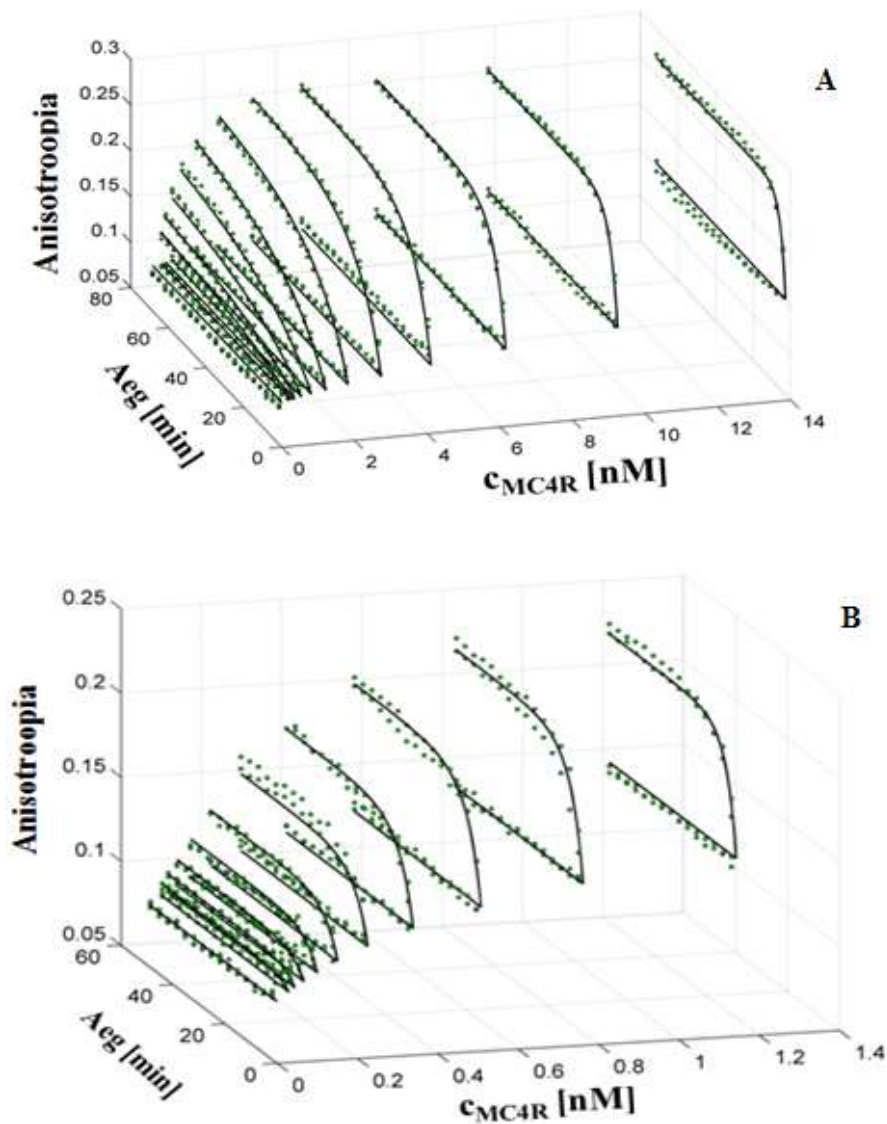
3.2.3 Fluorestsentsligandi seostumise uurimine MC₄ retseptorile

Assotsatsioonikineetika parameetrite arvutamisel tuleb arvesse võtta keerukamat reaktsiooni mehhanismi. Ligandi kontsentratsiooni muutust ajas, osa ligandi seostumist mittespetsiifiliselt ning muid parameetreid saab võtta arvesse mitmemuutuva funktsiooniga, nn globaalanalüüsiga. Mittespetsiifilise seostumise signaal võib olla tingitud ligandi seostumisest lahusesse jäänud suurematele osakestele või katseplaadi seintele.

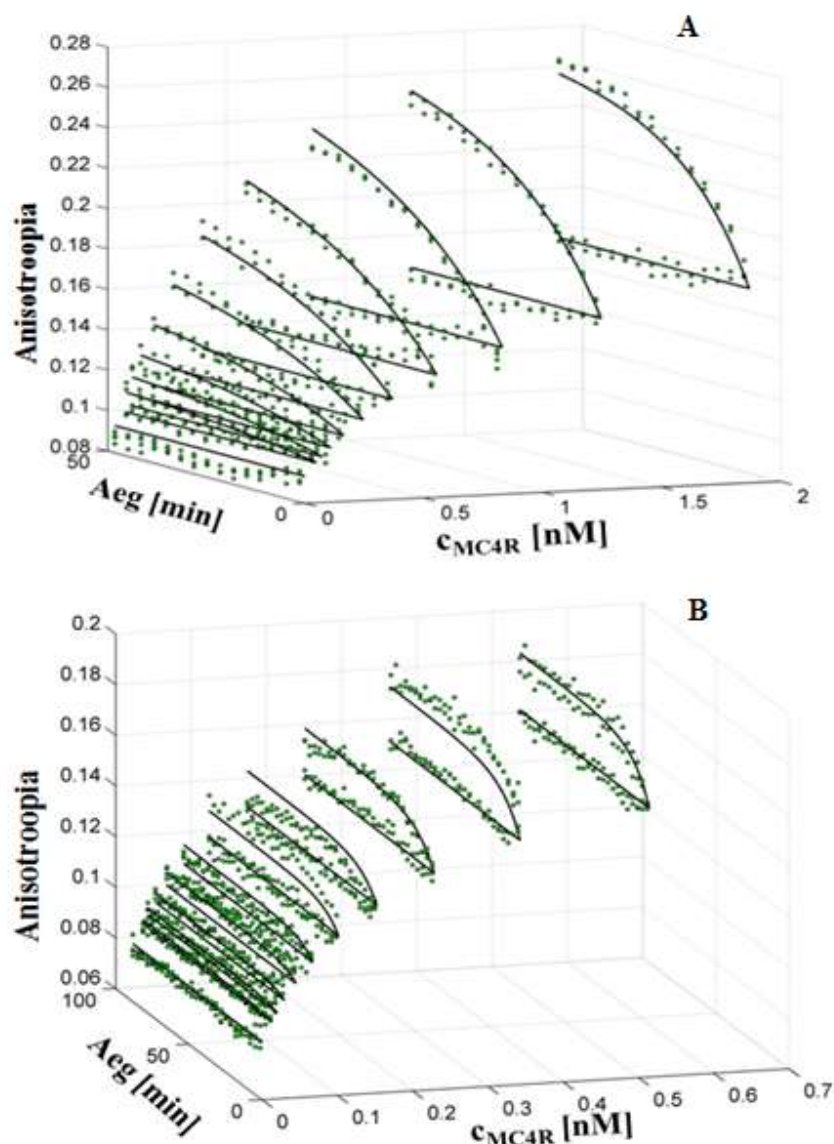
Saadud dissotsatsiooni kiiruskonstantide k_{off} alusel teostati assotsatsioonikineetika parameetrite arvutamine. Koos ja ilma metalliioonideta katsete puhul saadi kiiruskonstantideks vastavalt $k_{\text{on}}=0,027\pm0,001 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ning $k_{\text{on}}=0,182\pm0,013 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$. Sarnaselt dissotsatsiooniga on ka assotsatsioon kiirem metalliioonide puudumisel ning vastupidi.

Kuna konstandid muutusid ühes suurusjärgus vastupidise reaktsiooni kiiruskonstantidega, siis ei kajastu see arvutatud dissotsatsioonikonstantide K_d väärtustes. See tähendab et ligandi ja retseptori vaheline afiinsus ei muutunud või muutus väga vähe ning uuritud ioonid ei mõjutanud seda parameetrit.

Erinevuseks koos ja ilma ionideta katsete puhul oli detekteeritav retseptori kontsentratsioon. Tsentrifuugi abil ja TFF meetodil kogutud retseptori puhul olid erinevused vastavalt 8- ning 4-kordsed, kusjuures suurem kogus retseptorit leiti metalliioonide juuresolekul, mis viitab nende tähtsusele ligandi ja retseptori seostumisel, mida on ka varasemalt leitud (Link 2012).



Joonis 7. 1 nM Cy3B-SHU9119 analoog 1 assotsatsioonikineetika MC₄ retseptoritele seostumisel erinevatel retseptori kontsentratsioonidel vastavalt (A) koos ja (B) ilma metalliioonideta Krebs-Ringeri puhvris. Märgitud ajavahemikus mõõdeti fluorestsentsintensiivsusi koos ja ilma NDP- α -MSH-ta, mis teisendati anisotroopia väärtusteks valemit 1 kasutades. Retseptori kontsentratsioonid arvutati pärast seostumiskineetika globaalanalüüsi. Kasutatud MC₄ retseptoreid sisaldavad pungunud bakuloviirused on kontsentreeritud tsentrifuugiga. Assotsiatsioonikiiruskonstantideks saadi $k_{on}=0,027\pm0,001 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ja $k_{on}=0,182\pm0,013 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$.



Joonis 8 . 1 nM Cy3B-SHU9119 analoog 1 assotsatsioonikineetika MC₄ retseptoritele seostumisel erinevatel retseptori kontsentratsioonidel vastavalt (A) koos ja (B) ilma metallioonideta Krebs-Ringeri puhvis. Märgitud ajavahemikus mõõdeti fluorestsentsintensiivsusi koos ja ilma NDP- α -MSH-ta, mis teisendati anisotroopia väärtusteks valemit 1 kasutades. Retseptori kontsentratsioonid arvutati pärast seostumiskineetika globaalanalüüsi. Kasutatud MC₄ retseptoreid sisaldavad pungunud bakuloviirused on kontseentreeritud TFF meetodiga. Assotsiatsiooni kiiruskonstantideks saadi $k_{on}=0,027\pm0,003 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ja $k_{on}=0,09\pm0,03 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$.

TFF meetodil kogutud retseptori kontsentratsioonid olid võrreldes tsentrifuugi kasutades madalamad. See võis olla tingitud retseptoreid sisaldavate bakuloviiruste membraanide uhtumisest läbi filtri, mistõttu sattusid nad filtreerimise jääkide hulka. Ebaefektiivse lahuse puhastamise tulemusena võis ka osa MC₄ retseptoreid sisaldavaid viirusi jääda süsteemi. Kuna eesmärgiks on valideerida meetod, mis lihtsustaks suuremate retseptoreid sisaldavate lahuste kontsentreerimist, ei mängi süsteemi kaona jääv retseptorite hulk lahuste koguste suurenedes niivõrd suurt rolli, kui antud töös läbi viidud ruumaladega. Potentsiaalse saagiste erinevuse põhjuse leidmiseks tuleks fookuseeruda optimaalse membraani pooride suuruse kindlaks tegmisele.

Tabel 1. Retseptor-ligand interaktsioonide uurimise tulemusena saadud kokkuvõtlikud parameetrid.

Retseptorite kogumise meetod	Katses kasutatud puhver	d _{retseptor} [μg/l] ±SD	k _{on} [nM ⁻¹ min ⁻¹] ±SD	k _{off} [min ⁻¹] ±SD	K _d [nM]
Tsentrifugeerimine	Koos Ca ²⁺ ja Mg ²⁺	68±3	0,027 ± 0,001	0,0049 ± 0,0004	0,18
	Ilma Ca ²⁺ ja Mg ²⁺	8,4±0,9	0,182 ± 0,013	0,049 ± 0,008	0,27
TFF meetod	Koos Ca ²⁺ ja Mg ²⁺	20±2	0,027 ± 0,003	0,0041 ± 0,0007	0,15
	Ilma Ca ²⁺ ja Mg ²⁺	5,5±2,6	0,09 ± 0,03	0,048 ± 0,016	0,53

Joonise 8 põhjal võib öelda, et suurem osa proteaasidest sai 300 kD läbilaskvusega membraaniga eraldatud lahusest, kuna ei toimu spetsiifilise seostumise signaali langust ajas nagu täheldati 100 kD läbilaskvusega membraani puhul. Kinnitust asjaolule, et TFF meetodil jäi aga veel ebavajalikke valke MC₄ retseptoreid sisaldavasse lahusesse, annab kõrgem mittespetsiifilise seostumise signaal, mida illustreerivad joonisel 8 graafikute alumised kõverad.

Tabelis 1 toodud katseandmete põhjal on tõestatud tangentsiaalvoolu filtratsiooni meetodi asjakohasust MC₄ retseptoreid sisaldavate bakuloviiruste membraanide kontsentreerimiseks. Mõlemal meetodil kontsentreeritud retseptorpreparaadiga täheldati sarnaseid ioonmõjusid

ning arvutuste tulemusel saadi lähedased kineetilised parameetrid. Veenduti MC₄ retseptori funktsionaalsuses ning olemasolus lahuses, mida illustreerivad seostumiskõverad joonisel 7 ning 8. TFF süsteemi abiga saadavate retseptorite lahuste saagikuse suurendamiseks on vajalik edasine metoodika optimeerimine, mille esimesed olulised etapid on antud bakalaureusetöö raames läbi viidud ning mille tulemusena on valideeritud võimalus suuremate MC₄ retseptoreid sisaldavaid pungunud bakuloviiruste lahuste kontsentreerimine hea saagisega.

Melanokortiini retseptoreid sisaldavate pungunud bakuloviiruste kogumine tangensiaalvoolu filtratsiooni meetodil ja selle valideerimine

Anne Lille

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös teostati MC₄ retseptoreid sisaldavate pungunud bakuloviiruste membraanide kontsentreerimine varasemalt rakendatud tsentrifugeerimise meetodil ning uut tangensiaalvoolu filtratsiooni süsteemi kasutades. Valideerimine realiseeriti fluorestsentsanisotroopial põhineva meetodikaga uurides Cy3B-SHU9119 analoogi seostumiskineetikat MC₄ retseptorile.

Teoreetilises osas selgitati signaaliülekanne töötamist läbi GPCR-de keskendudes melanokortiini retseptoritele ning nende tähtsusele. Lühikärgeline anti bakuloviirustel põhinevast retseptori ekspressioonisüsteemist, millega toodeti vajalik valgukogus. Tutvustati fluorestsentspektroskoopilist FA-1 põhinevat meetodit ning selle rakendamist retseptor-ligand interaktsioonide kineetika uurimisel. Lähema vaatluse alla oli võetud tangensiaalvoolu filtratsiooni töömehhanism ning selle eelised seni kasutatud lahuste puhastamise ning kontsentreerimise meetodite ees. Lisaks selgitati metallioonide rolle organismis ning nende võimalikku tähtsust ligandide seostumisel retseptoritele.

Töö raames valideeriti TFF meetod kirjeldatud süsteemi jaoks tõmmates paralleele varasemalt teostatud tsentrifugeerimiskatsetega, mida korrati antud uurimuses parema võrreldavuse saavutamiseks. Retseptor-ligand interaktsioonide uurimise põhjal selgus, et kineetilised parameetrid ning ioonmõjudest tingitud efektid on omavahel sarnased. Erinevuseks osutus retseptori madalam saagis TFF meetodil, mis aga suuremate lahuse koguste puhul paraneb ja ei ole oluline probleem. Filtreerimise efektiivsuse tõstmiseks on plaanis teha jätkuvaid edasiarendusi, kuna see lihtsustaks suuremate retseptorite koguste kontsentreerimist ajaliselt.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ananthanarayanan, V. S., (1991). Peptide hormones, neurotransmitters, and drugs as Ca²⁺ ionophores: implications for signal transduction. *Biochem. Cell. Biol.* **69**, 93–95.

Ananthanarayanan, V. S., Kerman, A. (2006) Role of metal ions in ligand-receptor interaction: Insight from structural studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **246**, 53-59.

Chai, B., Neubig, R. R., Millhauser, G. L., Thompson, D. A., Jackson, P. J., Barsh, G. S., Dickinson, C. J., Li, J., Lai, Y., Gantz, I. (2003) Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein. *Peptides*. **24(4)**: 603-609.

Conn, P. J., Christopoulos, A., Lindsley, C. W. (2009) Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **8(1)**: 41-54.

Do, E. U., Jo, E. B., Choi, G., Piao, L. Z., Shin, J., Seo, M. D., Kang, S. J., Lee, B. J., Kim, K. H., Kim, J. B. and Kim, S. I. (2006) Melanocortin 4 receptors interact with antimicrobial frog peptide analogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 1094-1100.

Dugas H. (1996) Metal Ions, In: *Bioorganic Chemistry: a Chemical Approach to Enzyme Action*, pp. 388-481. Springer-Verlag, New York.

Elliott, W. H. and Elliott, D. C. (2009) Cell signalling, In: *Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 429-457. Oxford University Press Inc., New York.

Gantz, I., Fong, T. M. (2003). The melanocortin system. *Am. J. Physiol-Endoc.M.*, **284(3)**, E468-E474.

Gantz, I., Miwa, H., Konda, Y., Shimoto, Y., Tashiro, T., Watson, S. J., DelValle, J., Yamada, T. (1993) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 15174-15179.

Hogan, K., Peluso, S., Gould, S., Parson, I., Ryan, D., Wu, L., Visiers, I. (2006) Mapping the Binding Site of Melanocortin 4 Receptor Agonists: A Hydrophobic Pocket Formed by I3.28(125), I3.32(129), and I7.42(291) Is Critical for Receptor Activation. *J. Med. Chem.* **49(3)**, 911-922.

Hovius, R., Vallotton, P., Wohland, T. and Vogel, H. (2000) Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions. *Trends. Pharmacol. Sci.* **21**, 266-273.

Janakiraman, V., Forrest, W. F., Seshagiri, S. (2006) Estimation of baculovirus titer based on viable cell size. *Nat. Protoc.* **1**, 2271-2276.

Jarvis, D. L. (2009) Baculovirus-insect cell expression systems, In: *Guide to protein purification*, (Burgess R. Richard, Murray P. Deutscher) pp 210-211. Elsevier Inc., USA.

Koolman, J. and Roehm, K. H. (2003) PCR and protein expression, Viruses, In: *Color atlas of Biochemistry*, pp. 262-263, 404.

Kopanchuk, S., Veiksina, S., Petrovska, R., Mutule, I., Szardenings, M., Rinken, A., Wikberg, J. E. S. (2005) Co-operative regulation of ligand binding to melanocortin receptor subtypes: Evidence for interacting binding sites. *Eur. J. Pharmac.* **512**, 85-95.

Lakowicz, J. R. (2006) Fluorescence Anisotropy, In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp 353-381. Springer Science + Business Media, LLC, New York.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2008) The Foundations of Biochemistry, Biosignaling, Hormonal Regulation and Integration of Mammalian Metabolism In: *Principles of Biochemistry*, pp 1-41, 417-485, 901-945. W.H. Freeman and Company, New York.

Link, R. (2012) Bakalaureusetöö. Uute sünteetiliste fluorestsentsligandide seostumise kineetilise iseloomustamine MC₄ retseptorile.

Mountjoy, K. G., Mortrud, M. T., Low, M. J., Simerly, R. B., Cone, R. D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor MC4-R in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1298 - 1308.

Pall Life Sciences. (2009) User Guide. T-Series TFF Cassettes with Omega™ Membrane Care and Use Procedures. Pall Corporation.

PharMigen (1999) Baculovirus Expression Vector System Manual. Instruction Manual. PharMigen.

Rasmussen, H., Rasmussen, J. E., (1990). Calcium as intracellular messenger: from simplicity to complexity. *Curr. Top. Cell. Regul.* **31**, 1-109.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **450(7168)**: 383-387.

Schiöth, H. B.; Muceniece, R.; Wikberg J. E. S. (1996) Characterisation of the Melanocortin 4 Receptor by Radioligand Binding. *Basic. Clin. Pharmacol.* **79(3)**, 161-165.

Schneider, E. H., Seifer, R. (2010) Sf9 cells: A versatile model system to investigate the pharmacological properties of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Therapeut.* **128(3)**, 387-418.

Thompson, R. B., Gryczynski, I., Malicka, J. (2002) Fluorescence polarization standards for high-throughput screening and imaging. *BioTechniques* **32**, 34-42.

Veiksina, S., Kopanchuk, S., Rinken A. (2010) Fluorescence anisotropy assay for pharmacological characterization of ligand binding dynamics to melanocortin 4 receptor. *Anal. Biochem.* **402**, 32-39.

Vogel, C. H., Todaro, C. L., (1997). Cross-Flow Filtration, In: *Fermentation and biochemical engineering handbook*, pp 271-343. Noyes Publications, USA.

Wikberg, J. E. S. (1999). Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **375**, 295–310.

The concentration of melanocortin receptor containing budded baculoviruses by tangential flow filtration and validation of the method

Anne Lille

SUMMARY

The aim of this Bachelor's thesis was to validate the tangential flow filtration (TFF) method for concentrating budded baculoviruses containing MC₄ receptors. This is important because TFF is potentially more efficient and less time-consuming than other methods. In this study the concentration of MC₄ receptors by the new tangential flow system was compared to centrifugation, which has been previously shown as a successful method. Validation was performed by assays based on fluorescence anisotropy (FA) measurements examining the binding kinetics of Cy3b-SHU9119 analogue 1 to the MC₄ receptor.

In the literature review the principles of signal transduction and its operation through the G protein coupled receptors was described focusing on the melanocortin receptors and their importance in organisms. A brief review was given about baculovirus based receptor expression system, which was used to produce necessary protein quantities. For understanding receptor-ligand binding kinetic studies an introduction to fluorescence anisotropy based method was provided. The mechanism of tangential flow filtration was explained, together with its advantages over other solution purification and concentration methods. In addition, the role of metal ions in organisms was introduced as well as their potential significance in ligand-binding.

In the current study the efficiency of TFF system application was validated comparing it to previously successful centrifugation experiments, which were reproduced for better comparison. Examining receptor-ligand binding interactions similar kinetic parameters, as well as effects of metal ions to the binding, were obtained for both methods. Difference was shown in receptor concentration, which was significantly lower in TFF involved studies, but it does not constitute a problem when working with bigger solution quantities. For a more efficient application of TFF, further development of better conditions will be carried out. This method would make concentrating higher amounts of receptors more efficient by saving time.

LISAD

Kasutatud võrrandite süntaks GraphPad Prism™ 5.04 programmi jaoks.

Lisa 1. Assotsiatsioonikineetika analüüsi mudel (Veiksina *et al.* 2014)

$$Rt = \text{StockR} * \text{VolumeBV} / \text{WellVolume}$$

$$NS = \text{StockNS} * \text{VolumeBV} / \text{WellVolume}$$

$$\text{sum} = K_{\text{dns}} + NS + Lt$$

$$Lns = (\text{sum} - \sqrt{\text{sum}^2 - 4 * NS * Lt}) / 2$$

$$Lav = Lt - Lns$$

$$k_{\text{obs}} = \sqrt{k_{\text{on}}^2 * (Lav - Rt)^2 + k_{\text{off}}^2 + 2 * k_{\text{on}} * k_{\text{off}} * (Lav + Rt)}$$

$$gama = k_{\text{on}} * Lav * Rt$$

$$beeta = k_{\text{on}} * (Lav + Rt) + k_{\text{off}}$$

$$\omega = (k_{\text{obs}} - beeta) / (k_{\text{obs}} + beeta)$$

$$RL = (2 * gama / (k_{\text{obs}} + beeta)) * ((1 - \exp(-k_{\text{obs}} * X)) / (1 + \omega * \exp(-k_{\text{obs}} * X)))$$

$$\text{fractionRL} = RL / Lt$$

$$\text{fractionNS} = Lns / Lt$$

$$Stotal = \text{fractionRL} * A_{\text{bound}} + \text{fractionNS} * A_{\text{ns}} + A_{\text{free}} * (1 - \text{fractionRL} - \text{fractionNS})$$

$$Sns = \text{fractionNS} * A_{\text{ns}} + A_{\text{free}} * (1 - \text{fractionNS})$$

$$\langle A \rangle Y = Stotal$$

$$\langle B \rangle Y = Sns$$

$$\langle C \rangle Y = Stotal$$

$$\langle D \rangle Y = Sns$$

$$\langle \dots \rangle Y = S \dots \text{ until the number of curves used}$$

Lisa 2. Väljatõrjumiskõverate analüüsi mudel (Veiksina *et al.* 2014)

$$Rt = \text{StockR} * \text{VolumeBV} / \text{WellVolume}$$

$$NS = \text{StockNS} * \text{VolumeBV} / \text{WellVolume}$$

$$\text{sum} = K_{\text{dns}} + NS + L_t$$

$$L_{\text{ns}} = (\text{sum} - \sqrt{\text{sum}^2 - 4 * NS * L_t}) / 2$$

$$L_{\text{av}} = L_t - L_{\text{ns}}$$

$$A = K_d + K_i + L_{\text{av}} + X - R_t$$

$$B = (X - R_t) * K_d + (L_{\text{av}} - R_t) * K_i + K_d * K_i$$

$$C = -K_d * K_i * R_t$$

$$\text{Theta} = \arccos[(-2 * A^3 + 9 * A * B - 27 * C) / (2 * \sqrt{(A^2 - 3 * B)^3})]$$

$$\text{fractionRL} = ((2 * \sqrt{A^2 - 3 * B} * \cos(\text{Theta}/3) - A) /$$

$$(3 * K_d + 2 * \sqrt{A^2 - 3 * B} * \cos(\text{Theta}/3) - A))$$

$$\text{fractionNS} = L_{\text{ns}} / L_t$$

$$\text{Stotal} = \text{fractionRL} * A_{\text{bound}} + \text{fractionNS} * A_{\text{ns}} + A_{\text{free}} * (1 - \text{fractionRL} - \text{fractionNS})$$

Lisades 1 ja 2 toodud tähistused:

- Assotsiatsioonikineetika katsete puhul on X mõõtmispunktiledele vastav aeg, mis paikneb x -teljel. L_t või VolumeBV (sõltuvalt eksperimendi ülesehitusest) on fluorestsentskigandi totaalse kontsentratsiooni või bakuloviirusvaru väärtused on veergude pealkirjaks programmis GraphPad Prism 5.0.
- Väljatõrjumiskatsete puhul on X x -telejele kantud väljatõrjuva ligandi kontsentratsioon (nM).
- R_t vastab totaalsele retseptori kontsentratsioonile süvendis $[R]_T$
- StockR on retseptori kontsentratsioon viirusvarus $[R]_{\text{viirusvaru}}$
- VolumeBV on bakuloviirusvaru ruumala süvendi kohta V_{BV}
- WellVolume on totaalne reaktsioonisegu ruumala süvendis $V_{\text{süvend}}$
- NS vastab totaalsele ligandi mittespetsiifiliste seostumiskohtade kontsentratsioonile süvendis
- StockNS on mittespetsiifiline seostumiskohtade kontsentratsioon viirusvarus $[NS]_{\text{viirusvaru}}$
- K_{dns} on mittespetsiifilise seostumise näiv afiinsus K_d^{ns}
- L_t on fluorestsentsligandi totaalne kontsentratsioon $[L]_t$
- L_{ns} on fluorestsentsligandi kontsentratsioon, mis ei ole retseptorile seostumiseks kättesaadav mittespetsiifilise seostumise tõttu $[L]_{\text{ns}}$

- L_{av} on fluorestsentsligandi kontsentratsioon, mis on kättesaadav spetsiifilise seostumisreaktsiooni jaoks retseptoriga $[L]_{av}$
- k_{obs} on jälgitav assotsiatsiooni kiiruskonstant k_{obs}
- k_{on} on assotsiatsiooni kiiruskonstant k_{on}
- k_{off} on dissotsiatsiooni kiiruskonstant k_{off}
- γ , β , ω , Σ , Σ_{sum} , A , B , C , Θ on abistavad empiirilised parameetrid
- RL on moodustuv retseptor-ligand kompleks ja see kajastab fluorestsentsligandi spetsiifilise seostumise taset retseptorile
- fraction_{RL} on retseptorile seostunud ligandi fraktsioon
- fraction_{NS} on mittespetsiifiliselt seostunud ligandi fraktsioon
- S_{total} on mõõdetud fluorestsentsanisotroopia signaalmärgistamata ligandi puudumisel
- S_{ns} on mõõdetud fluorestsentsanisotroopia signaal märgistamata ligandi juuresolekul
- A_{bound} on ligandi spetsiifiliselt retseptorile seostumise taset iseloomustav fluorestsentsanisotroopia väärtus
- A_{ns} on ligandi mittespetsiifilise taset iseloomustav fluorestsentsanisotroopia väärtus
- A_{free} on vabale ligandile vastav anisotroopia väärtus